

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450157

研究課題名(和文) イネにおけるジャスモン酸非依存性病害抵抗性発現機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of jasmonate-independent signal transduction pathways leading to phytoalexin production in rice

研究代表者

山根 久和 (YAMANE, Hisakazu)

帝京大学・理工学部・教授

研究者番号：80090520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：イネの代表的な病害抵抗性反応であるファイトアレキシン生産へ至るシグナル伝達は、ジャスモン酸(JA)依存性経路とJA非依存性伝達経路で制御されている。本研究では、様々なストレスによるファイトアレキシン生産において、JA非依存性経路が機能しており、JA非依存性経路においては二次シグナル物質としてサイトカイニン(CK)が機能している可能性を示した。また、ファイトアレキシン生産においてJAとCKが相互に抑制的に機能していることも明らかにした。以上のようなCKの機能を確認するため、現在、CRISPR-Cas9を用いたゲノム編集の手法を用いてCK生合成変異体の作製を試みている。

研究成果の概要(英文)：Phytoalexins are antifungal secondary metabolites produced in response to pathogen infection in higher plants. It has been shown that signal transduction pathways leading to phytoalexin production are regulated by jasmonate (JA)-dependent and JA-independent pathways in rice. In this study, we suggested that the JA-independent pathway functions in the phytoalexin production induced by several abiotic stresses as well as pathogen infection, and that cytokinin functions as a second signal in the JA-independent pathway. In addition, we found cross-talk between JA and CK in the regulation of phytoalexin

研究分野：農学

キーワード：イネ 病害抵抗性 ファイトアレキシン ジャスモン酸 サイトカイニン エリシター シグナル伝達
ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

(1) ジャスモン酸(JA)は、ストレス応答、生殖器官形成、塊茎形成誘導等の重要な生理機能を果たしている植物ホルモンであるが、単子葉植物であるイネにおける JA の生理機能については多くが未解明である。これは、これまで性状解析が十分に行われた JA 生合成変異体が多かったことが原因の一つと考えられる。そこで、申請者らは、大阪市立大学の飯野教授、カールスルーエ工科大学(ドイツ)の Riemann らとの共同研究でイネの JA 生合成変異体候補である *cpm2*、*hebiba* について詳細な解析を行い、それらがともに *allene oxide cyclase (AOC)* 遺伝子の deletion 突然変異体であることを明らかにした(Riemann et al. 2013)。イネにおいて *AOC* 遺伝子は 1 コピーしか存在しないため、*cpm2* や *hebiba* においては、JA 生合成が顕著に抑制されている。一方、シロイヌナズナにおける *JAR1* は、JA を活性型と考えられるジャスモン酸-イソロイシン複合体(JA-Ile)へ変換する酵素であるが、イネにおいて *JAR1* のオルソログと考えられる遺伝子(*OsJAR1*)の遺伝子領域に、内在性レトロトランスポゾン *Tos17* が挿入された *osjar1* 変異株が存在していた。申請者らは、*osjar1* 変異株植物体について、内生 JA 類の定量分析、JA 応答性遺伝子の発現解析等を行い、当該変異株が JA-Ile 生産能を欠損しており、JA-Ile には応答するが、JA には応答しないことを明らかにした(Shimizu et al. 2013)。

(2) イネにおいて JA 処理によりファイトアレキシンの生産が誘導されることはよく知られている。そこで、申請者らは、*cpm2* および *osjar1* を用いて JA のファイトアレキシン生産における役割の解析を行った。重金属エリ

シターである塩化銅(II)や JA でイネを処理するとジテルペン型のファイトアレキシンやフラボノイド型のファイトアレキシンであるサクラネチンの生産が誘導される。塩化銅(II)処理では JA の生産も誘導されるので(Rakwal et al. 1996)、最近まで、イネのファイトアレキシン生産は JA を介したシグナル伝達経路で制御されていると考えられていた。ところが、*cpm2* に塩化銅(II)処理するとサクラネチン生産は顕著に抑制されたが、ジテルペン型ファイトアレキシン生産は野生型イネに塩化銅(II)処理した場合と同等あるいはそれ以上であった。また、*cpm2* において抑制されていたサクラネチンの生産は JA の同時投与により野生型のレベルまでに回復した(Shimizu et al. 2013)。一方、*osjar1* に塩化銅(II)処理を行うと *cpm2* の場合と同様にサクラネチンの生産は顕著に抑制されたが、ジテルペン型ファイトアレキシンの生産は野生型イネに塩化銅処理した場合と同等であった。*osjar1* に JA を処理するとジテルペン型ファイトアレキシンもサクラネチンの生産も顕著に抑制されたが、JA-Ile を処理すると両タイプのファイトアレキシンの生産が野生型のイネと同等のレベルで認められた。以上の結果は、イネのジテルペン型ファイトアレキシン生産においては、JA 依存性経路だけでなく、JA 非依存性経路が機能しており、サクラネチン生産は JA 依存性経路のみで制御されることを強く示唆するものと考えられる。

2. 研究の目的

(1) 申請者らの研究により初めて存在が明らかになった、ジテルペン型ファイトアレキシン生産に至る JA 非依存性シグナル伝達経路を解明する足掛かりを得るため、JA 非依

性のファイトアレキシン生産に至るシグナル伝達経路において重要な機能を果たしている鍵転写因子を同定し、その機能を解明する。

(2) JA非依存性経路において機能する低分子の二次シグナル物質を同定し、その防御応答における機能を物質レベル、遺伝子レベルで解析する。

3. 研究の方法

(1) JA非依存性のシグナル伝達において機能する鍵転写因子の単離・解析

野生型と *cpm2* の葉身をそれぞれ塩化銅(II)処理した後、経時的にサンプリングし、得られた植物材料から RNA を抽出精製し、マイクロアレイを用いてトランスクリプトーム解析を行った。また、農業生物資源研究所グループとの共同研究では、データベース Rice FRENDS (<http://ricefrends.dna.affrc.go.jp>) を使用して同定された、ジテルペン型ファイトアレキシンの生合成酵素遺伝子と同調的に発現する転写因子遺伝子の過剰発現体や発現抑制体について、ジテルペン型ファイトアレキシンの内生レベルを LC-MS/MS 法により定量した。

(2) JA非依存性のシグナル伝達に關与する二次シグナル物質の追究

我々のグループによる先行研究で、ジテルペン型ファイトアレキシンの生産を誘導することが明らかになっていた植物ホルモンであるサイトカイニンに着目し、各種ストレス処理におけるサイトカイニン生産とジテルペン型ファイトアレキシン生産との関連を解析した。ファイトアレキシンの生産制御に關与する JA やサイトカイニンの内生レベルは、内部

標準を用いて LC-MS/MS 法により定量した。ファイトアレキシン誘導活性は、イネ葉身から作製した内径 6 mm のリーフディスクを用いて検定した。

4. 研究成果

(1) ジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子の発現を制御する転写因子の単離と機能解析

塩化銅(II)処理した野生型と *cpm2* の葉身を植物材料として用いた経時的トランスクリプトーム解析の結果、*cpm2* で野生型と同等に機能すると考えられる 6026 遺伝子が同定され、その中には塩化銅(II)処理後 2 時間以内に誘導される、約 50 個の早期応答性転写因子の存在が明らかになった。現在、これら 50 個の転写因子について機能解析を進めている。一方、農業生物資源研究所グループがジテルペン型ファイトアレキシンの生産制御を調節する転写因子候補として見出した DPF については、過剰発現体、発現抑制体におけるジテルペン型ファイトアレキシンの LC-MS/MS 分析を行い、過剰発現体の葉身では数百倍から数千倍に増産されていること、発現抑制体の根においてはそれらの蓄積量が顕著に減少したことを示した。こうして、DPF はイネにおけるジテルペン型ファイトアレキシンの生産を制御する鍵転写因子であることが明らかになった。しかしながら、DPF は JA 処理によっても誘導されるので、JA 依存性、非依存性シグナル伝達経路が合流したあとで機能する転写因子と考えられる。現在、DPF の JA およびサイトカイニンによる発現誘導機構を追究している。

(2) JA 酸非依存性シグナル伝達経路においてジテルペン型ファイトアレキシン生産に關

与する二次シグナルの追究

すでに述べたように、サイトカイニンがJA非依存性シグナル伝達経路で二次シグナルとして機能する可能性が考えられることから、まず、野生型と *cpm2* の葉身において、塩化銅(II)処理(病原菌感染と同様にイネに病害抵抗性反応を誘導する)によりサイトカイニンの生産が誘導されるかどうかを調べたところ、処理後6時間で増加し始め24時間で最大レベルに達することが明らかになった。また、サイトカイニンが、野生型でも *cpm2* においても同等にジテルペン型ファイトアレキシンを誘導することやジテルペン型ファイトアレキシン生産に至るシグナル伝達において、JAとサイトカイニンが相互に抑制的に機能していることも示された。*cpm2* においては、塩化銅(II)処理により、サイトカイニンが野生型以上のレベルで生産誘導されることから、JAはサイトカイニン合成に関しても抑制的に機能しているものと考えられる。また、ファイトアレキシン生産を誘導するUV-C照射やセレブロシド処理により、*cpm2* において野生型以上のレベルでジテルペン型ファイトアレキシンが誘導され、さらにそれに先行してサイトカイニンの生産も誘導されていることが分かった。こうして、JA非依存性のファイトアレキシン生産は、様々なストレスによって誘導され、JA依存性のストレス応答を補完する機能を有することが強く示唆された。

一方、イネ葉身において、塩化銅(II)処理により誘導されるサイトカイニン合成酵素を分子生物学的手法により探索したところ、LOGL9とIPT3が塩化銅(II)誘導のサイトカイニン合成において鍵酵素として機能している可能性が示された。JA非依存性のジテルペン型ファイトアレキシン生産におけるサイト

カイニンの機能を確認するため、現在、ストレス誘導的なサイトカイニン合成が起こらない変異体の取得を目指し、LOGL9とIPT3の遺伝子破壊株の作製をCRISPR-Cas9を用いたゲノム編集の手法を用いて試みている。

<引用文献>

Riemann et al. Identification of rice ALLENE OXIDE CYCLASE mutants and the function of jasmonate for defence against *Magnaporthe oryzae*. Plant J, 74(2), 226-238 (2013).

Shimizu et al. OsJAR1 contributes mainly to biosynthesis of the stress-induced jasmonoyl-isoleucine involved in defense responses in rice. Biosci Biotechnol Biochem, 77(7), 1556-1564 (2013).

Rakwal et al. Role of jasmonic acid as a signaling molecule in copper chloride-elicited rice phytoalexin production. Biosci Biotechnol Biochem, 60(6), 1046--1048 (1996).

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

Miyamoto K, Isami Enda I, Okada T, Sato Y, Watanabe K, Sakazawa T, Yumoto E, Shibata K, Asahina M, Iino M, Yokota T, Okada K, and Yamane H, Jasmonate is Required for Flavonoid Phytoalexin Production in Ultra Violet-Irradiated Rice Leaves, Biosci Biotechnol Biochem, 査読有、in press (2016). DOI: 10.1080/09168451.2016.1189319

Yamamura C, Mizutani E, Okada K, Nakagawa H, Fukushima S, Tanaka A, Maeda

S, Kamakura T, Yamane H, Takatsuji H, and Mori M, DITERPENOID PHYTOALEXIN FACTOR, a bHLH Transcription Factor, Plays a Central Role in the Biosynthesis of Diterpenoid Phytoalexins in Rice. Plant J, 査読有, 84: 1100-1113 (2015). DOI: 10.1111/tpj.13065

[学会発表] (計 10 件)

山村千紘、水谷恵美、田中惇訓、福島説子、岡田憲典、鎌倉高志、山根久和、高辻博志、森 昌樹、イネの転写因子 DPF による根でのジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子及び共発現遺伝子の転写制御機構の解析、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 28 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

Hisakazu Yamane, Kazunori Okada, Masaki Mori and Tomonobu Toyomasu, Biosynthesis of phytoalexin biosynthesis and its regulatory mechanism in rice, The 3rd Seminar on Biotechnology, Graduate School of Universitas Gadjah Mada Graduate Program in Biotechnology, 2015 年10月31日、Yogyakarta (Indonesia)

山村千紘、水谷恵美、岡田憲典、鎌倉高志、山根久和、高辻博志、森 昌樹、イネの転写因子 DPF はジテルペン型ファイトアレキシン生合成において中心的な役割を果たしている、第 50 回植物化学調節学会、2015 年 10 月 25 日、東京大学農学部 (東京都文京区)

堤 涼、宮本皓司、根元圭一郎、澤崎達也、森 昌樹、山根久和、野尻秀昭、岡田憲典、イネ Diterpene Phytoalexin Factor のジャスモン酸誘導発現を担う新規転写因子の探

索、第 50 回植物化学調節学会、2015 年 10 月 25 日、東京大学農学部 (東京都文京区) 宮本皓司、遠田勇海、岡田利樹、佐藤由実子、渡辺航平、酒澤智子、湯本絵美、柴田恭美、朝比奈雅志、横田孝雄、飯野盛利、岡田憲典、山根久和、イネにおける UV 誘導的ファイトアレキシン生産の制御機構へのジャスモン酸の関与、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 28 日、岡山大学 (岡山県岡山市)

山村千紘、水谷恵美、福島説子、鎌倉高志、岡田憲典、山根久和、高辻博志、森 昌樹、イネの転写因子 DPF によるジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子の転写制御機構の解析、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 28 日、岡山大学 (岡山県岡山市)

堤 涼、宮本皓司、山根久和、野尻秀昭、森 昌樹、岡田憲典、イネのファイトアレキシン生産を制御する転写因子 DPF のジャスモン酸による発現誘導機構の解析、植物化学調節学会第49回大会、2014年10月18日、京都大学 (京都府京都市)

山村千紘、水谷恵美、福島説子、前田哲、松下茜、鎌倉高志、岡田憲典、山根久和、高辻博志、森 昌樹、イネの転写因子 DPF によるジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子の転写活性化に関わるシス因子の解析、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 30 日、明治大学生田キャンパス (神奈川県川崎市)

堤 涼、宮本皓司、山根久和、野尻秀昭、森 昌樹、岡田憲典、イネのジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子の発現を制御する転写因子 DPF の機能解析、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 30 日、

明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市)

水谷恵美、山村千紘、福島説子、中川仁、前田哲、松下茜、鎌倉高志、岡田憲典、山根久和、高辻博志、森昌樹、イネの転写因子 DPF は N-box を介してジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子の転写を制御する、植物化学調節学会第 48 回大会、2013 年 10 月 31 日、新潟大学(新潟県新潟市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山根 久和 (YAMANE, Hisakazu)

帝京大学・理工学部・教授

研究者番号：80090520

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし